



Process for the preparation of lymphokines by induction of lymphoid cells**Publication number:** DE3704389 (A1)**Publication date:** 1988-08-25**Inventor(s):** MOHR HARALD DIPL CHEM DR [DE]**Applicant(s):** BLUTSPENDEDIENST DT ROTE KREUZ [DE]**Classification:**

- international: C07K14/52; A61K38/00; C07K14/435; A61K38/00; (IPC1-7): C07D493/22; C07K15/06; A61K37/02; A61K45/02; C07K15/14; C07K15/26; A61K37/02; A61K45/05; C07D323/00; C07D493/22

- European: C07K14/52

Application number: DE19873704389 19870212**Priority number(s):** DE19873704389 19870212**Also published as:** DE3704389 (C2)**Cited documents:** DE3411184 (A1)**Abstract of DE 3704389 (A1)**

Lymphokines can be prepared by induction of lymphoid cells with customary stimulators if bryostatin, which has antineoplastic activity, is employed instead of the costimulators PMA and teleocidin which are known to be tumour promoters.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(25 mM) und Antibiotika (je 10 µg/ml Neomycin und Streptomycin) enthielt, suspendiert. Der Proteingehalt wurde mit humanem Plasmaprotein auf 0,5 bis 1 mg/ml eingestellt. Das Volumen der Zellkultur betrug im allgemeinen 20 ml in 100-ml-Erlenmeyerkolben.

Den Zellkulturen wurden Mitogene und PMA, Teleocidin bzw. Bryostatin 1, 2 und 8 (extrahiert aus Bryozoa *Bugula neritina* und phylum [*Amathia convoluta*]) zugesetzt. Die eingestellten Konzentrationen von Mitogenen, PMA und Bryostatin (Bryo) sowie die erhaltenen IL-2- und IFN- γ -Konzentrationen ergeben sich aus der Tabelle 1.

Tabelle 1

Vergleich des Einflusses von Bryostatin (20 ng/ml) und PMA (10 ng/ml) auf die durch verschiedene Mitogene induzierte IL-2 und IFN- γ -Synthese.

Mitogen	ng/ml	IL-2 U/ml	+ PMA	+ Bryo	IFN- γ U/ml	+ PMA	+ Bryo
A 23 187	0,15	15	1520	1510	800	8000	8000
PHA-M	(4%)	< 10	800	1110	300	1600	1600
SEA	0,02	< 10	160	100	800	1600	800
ConA	25	< 10	280	370	200	2400	2400
SEB	0,1	13	100	100	800	800	400

Die Mitogen und Costimulator enthaltenden Zellsuspensionen wurden unter leichtem Schütteln bei 37°C 48 bis 72 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und der Zellkulturüberstand isoliert.

Beispiel 2

Spenderblut wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Dann wurde der Plasmaüberstand isoliert und die darin befindlichen Leukocyten durch Zentrifugation gewonnen. Die Zellen wurden, wie in Beispiel 1 angegeben, im Zellkulturmedium suspendiert, stimuliert und inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand isoliert. Es wurden die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 1 erhalten.

Die Bestimmung der IFN- γ -Konzentration erfolgte nach üblichen Methoden (J. Virol. 37, 755 [1981]). Die erhaltenen Titer wurden gegen den internationalen Standard für IFN- γ Gg 23-901-539 des National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) geeicht.

Die Bestimmung von IL-2 erfolgte über einen Lymphoblasten-Proliferationstest, der nach der Erfahrung der Anmelder den Vorteil hat, daß er nicht von PMA und anderen erfindungsgemäß einzusetzenden Substanzen beeinträchtigt wird. Für die Blastogenese wurden mononukleare Blutzellen aus Spenderblut bei einer Dichte von 7×10^5 /ml in RPMI 1640 + 5% menschliches Serum suspendiert und in Gegenwart von Concanavalin A (10 µg/ml) 4 bis 5 Tage bei 37°C in feuchter, 5% Kohlendioxid enthaltender Atmosphäre suspendiert. Die Blasten wurden auf 5×10^5 /ml mit dem gleichen Kulturmedium eingestellt. 100 µl Teile der Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen von Verdünnungen der IL-2 enthaltenden Proben gemischt und ca. weitere 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Leukocytenzähler der Firma TOA Medical Electronics (Tokyo) gezählt. Die erhaltenen Zählraten wurden mit denjenigen verglichen, die mit Verdünnungen der vorläufigen IL-2-Standardpräparation ISDP 841 der NIH erhalten wurden.

Die Konzentrierung der Lymphokine erfolgte analog zu dem in Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78 (3), 1601 (1981) beschriebenen Verfahren, mit der Ausnahme, daß anstelle von Glas mit einheitlichem Porenvolumen zur Extraktion der Lymphokine enthaltenen Proteinfractionen aus den überstehenden Kulturflüssigkeiten poröses Silicagel mit einem mittleren Porendurchmesser von 100 Angström (Matrex Silicagel der Firma Amicon, Witten) verwendet wurde. 10 g Silicagel wurden zu 1 l der überstehenden Zellkulturflüssigkeit gegeben; die Suspension wurde ca. 30 Minuten gereinigt. Das Gel wurde isoliert, in eine Chromatografierkolonne gegeben und gründlich mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Gebundenes Material wurde mit Phosphatpuffer (10 mM) mit einem pH von 7,4 und einem Gehalt von 0,5 n NaCl und 50% Ethylenglykol, eluiert. In bezug auf die Zellkulturflüssigkeit betragen die Ausbeuten an IL-2 und IFN- γ nahe 100%.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach einem üblichen Verfahren (Nature 227, 680 [1970]); die Proteinbanden wurden durch Anfärbung mit Silber sichtbar gemacht.

Obwohl die Ausführungsbeispiele lediglich die Isolierung von IL-2 und IFN- γ behandeln, ist die Erfindung nicht auf die Herstellung dieser Lymphokine beschränkt. Die übrigen, eingangs genannten Lymphokine sind in den erfindungsgemäß erhaltenen Zellkulturflüssigkeiten nach dem Fachmann geläufigen Methoden nachgewiesen worden; sie können nach ebenfalls üblichen Methoden isoliert werden.